

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

KEEMIA INSTITUUT  
BIOORGAANILISE KEEMIA ÕPPETOOL

Laura Läll

**TSÜTOKROOM C OKSIDAASI AKTIIVSUSE MÕÕTMINE 96  
SÜVENDIGA KATSEPLAADIL**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: teadur Argo Vonk, PhD

TARTU 2013

## KASUTATUD LÜHENDID

·QH – semikinoon

$\Delta G$  – Gibbsi vabaenergia muut

ADP –adenosiindifosfaat

ATP – adenosiintrifosfaat

COX – tsütokroom *c* oksidaas

DNA – desoksüribonukleiinhape

DPBS – Dulbecco's fosfaatpuhverdatud saliin

DTT – ditiotreitool

FADH<sub>2</sub> – redutseeritud vormis flaviin adeniin nukleotiid

mtDNA – eukarüootse raku mitokondris paiknev desoksüribonukleiinhape

NADH – redutseeritud vormis nikotiinamiid adeniin dinukleotiid

nDNA – eukarüootse raku tuumas paiknev desoksüribonukleiinhape

P<sub>a</sub> – anorgaaniline fosfor

Q – ubikinoon

QH<sub>2</sub> - ubikinool

SEM – keskmise standardhälve (*Standard Error of Mean*)

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID .....	2
SISSEJUHATUS.....	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	6
1.1 Hingamisahel ja oksüdatiivne fosforüleerimine .....	6
1.1.1 Mitokonder.....	6
1.1.2 Mitokondri hingamisahel .....	7
1.1.3 Hingamisahela seos oksüdatiivse fosforüleerimisega.....	9
1.2 Hingamisahela kompleks IV .....	10
1.2.1 Tsütokroom <i>c</i> oksidaas .....	10
1.2.2 Tsütokroom <i>c</i> .....	12
1.2.3 Elektronide ja prootonite transport hingamisahelas.....	14
1.3 Hingamisahela häiretega seotud haigused .....	16
1.4 Spektrofotomeetriline meetod ensüümkinetika uurimiseks.....	17
1.5 COX-i aktiivsuse määramine.....	17
2 EKSPERIMENTAALNE OSA.....	19
2.1 Materjalid ja meetodika.....	19
2.1.1 Aparatuur ja töövahendid.....	19
2.1.2 Tsütokroom <i>c</i> töölahuse valmistamine .....	19
2.1.3 COX-i aktiivsuse määramine .....	20
2.1.3.1 Koe homogeniseerimine ja töölahuse valmistamine .....	20
2.1.3.2 Mõõtmised spektrofotomeetriga .....	21
2.1.3.3 Mõõtmised plaadilugejaga .....	21
2.1.4 Andmete analüüs.....	22
3 TULEMUSED JA ARUTELU.....	23
3.1 Redutseeritud tsütokroom <i>c</i> puhtuse kontrollimine.....	23
3.2 Tsütokroom <i>c</i> autooksüdatsioon.....	24

3.3 Plaadilugejale optimaalse filtri valimine .....	25
3.4 Küvetis spektrofotomeetriga mõõtmise tulemused .....	26
3.5 96 süvendiga katseplaadil plaadilugejaga mõõtmise tulemused .....	27
3.6 Kahe meetodi tulemuste võrdlus .....	28
KOKKUVÕTE.....	31
TÄNUAVALDUSED .....	32
KASUTATUD KIRJANDUS .....	33
SUMMARY .....	36

## SISSEJUHATUS

Tsütokroom *c* oksidaas on eükarüootsete rakkude mitokondris asuva hingamisahela üks olulisemaid ensüüme. Olulisemaks võib teda pidada seetõttu, et tegu on tihtipeale kogu ahela tööprotsessi kiirust limiteeriva etapiga. Lisaks seob tsütokroom *c* oksidaas hingamisahela oksüdatiivse fosforüleerimisega. Seetõttu võib organismi peamise energiaallika adenosiintrifosfaadi süntees otseselt sõltuda just selle ensüümi aktiivsusest. Et tegemist on kriitilise etapiga organismi elutegevuseks vajaliku energia tootmisel, põhjustab tsütokroom *c* oksidaasi vähenenud aktiivsus või madal ekspressioon tõsiseid metaboolseid häireid. See omakorda on asetanud tsütokroom *c* oksidaasi struktuuri, talitluse ja aktiivsuse uurimise tähtsale kohale teadusmaastikul.

Tuntumateks tsütokroom *c* oksidaasiga seotud haigusteks on näiteks Alzheimeri, Parkinsoni ja Huntingtoni tõbi, kuid leidub ka haruldasemaid haigusi, mis võivad väljenduda selliste sümptomitena nagu lihaste kärbumine ning tasakaalu- ja kõnehäired. Lisaks eelnimetatutele on leitud seos tsütokroom *c* oksidaasi aktiivsuse muutuste ja depressiooni vahel. Seda teemat uuritakse aktiivselt Tartu Ülikooli Psühholoogia Instituudi psühhofüsioloogia töögrupis erinevate depressiooni loomudelite abil. Just seetõttu on nimetatud töögrupi huviorbiidis katseloomade aju eri struktuurides tsütokroom *c* oksidaasi aktiivsuse määramine.

Siiani on levinumaks tsütokroom *c* oksidaasi aktiivsuse määramise viisiks olnud lahuste neelduvuse mõõtmisel põhinev spektrofotomeetriline meetod, mis on aga küllaltki aja- ja materjalikulukas ning seetõttu ei sobi väga hästi suures hulgas koeproovides ensüümi aktiivsuse uurimiseks. Käesoleva bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks oli välja töötada ja optimeerida samuti neelduvusel põhinev meetod katseloomade ajukudedes tsütokroom *c* oksidaasi aktiivsuse määramiseks plaadilugejaga 96 süvendiga katseplaadil. Selline meetod võimaldaks ensüümi aktiivsuse hindamist teostada varasemast oluliselt kiiremini ja väiksema hulga materjalidega.

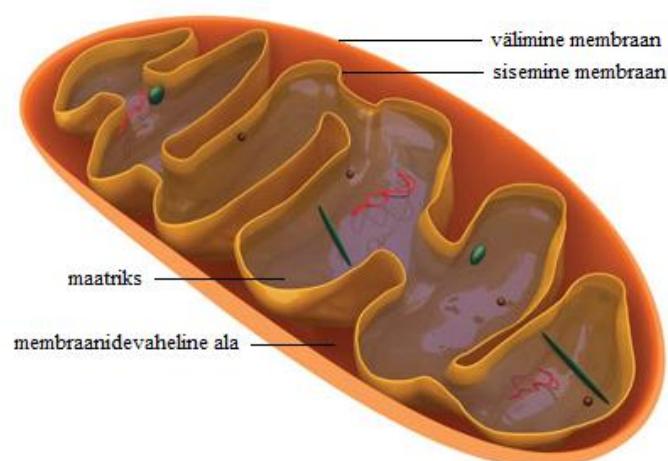
# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Hingamisahel ja oksüdatiivne fosforüleerimine

### 1.1.1 Mitokonder

Mitokonder on eukarüootsete rakkude tsütoplasmas paiknev raku organell, mis jaguneb neljaks osaks – välimine membraan, membraanide vaheline ala, sisemine membraan ja maatriks (joonis 1). Välimise membraani peamiseks ülesandeks on organelli kuju säilitamine (Garrett ja Grisham 1999). Sisemisel membraanil lasub aga mitokondri üks olulisemaid ülesandeid, mille avastasid 1948. aastal Eugen Kennedy ja Albert Lehninger. Nimelt näitasid nad, et just seal toimub põhiline keemilise energia tootmine adenosüintrifosfaadi (ATP) näol ehk oksüdatiivne fosforüleerimine. Teisisõnu paikneb seal ATP sünteesiks vajaminev neljast erinevast ensüümkompleksist koosnev hingamisahel ja oksüdatsiivset fosforülatsiooni läbi viiv ATP-süntaas (Lehninger *et al.* 2004).

Sisemise membraaniga ümbritsetud maatriks sisaldab enamikku tsitraaditsükli ja rasvhapete oksüdatsiooni reaktsioone katalüüsivaid ensüüme. Lisaks leidub mitokondris DNA (mtDNA), millel on koos ribosoomide ja ensüümidega oluline roll mitokondri genoomi poolt kodeeritavate valkude sünteesimisel. Kuigi valdav enamus mitokondri valkudest kodeeritakse raku tuumas paikneva DNA (nDNA) poolt, on mitmed hingamisahela ensüümid kodeeritud mtDNA poolt (Garrett ja Grisham 1999).

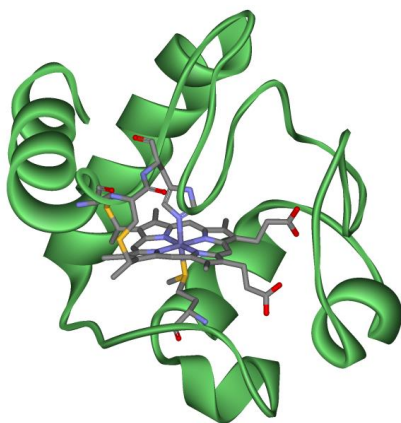


**Joonis 1.** Mitokondri ehitus. Joonisel on välja toodud välimise ja sisemise membraani, maatriksi ja membraanidevahelise ala asukohad mitokondris. Kohandatud. (Canadian Chiropractor).

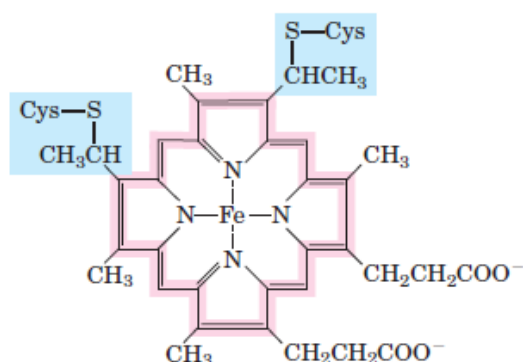
### 1.1.2 Mitokondri hingamisahel

Raku hingamiseks nimetatakse protsessi, mille käigus rakud tarvivad hapnikku ning vabaneb süsihappegaas. Selline protsess on jaotatud kolmeks erinevaks etapiks. Esmalt oksüdeeritakse toidust omistatavad ühendid, nagu glükoos, rasvhapped ja mõned aminohapped, kahte süsinikku sisaldavateks atsetüülfragmentideks ja seotakse koensüüm A-ga. Järgmiseks toimub atsetüülrühmade sisenemine tsitraaditsükklisse, kus need ensüümide abil süsihappegaasiks oksüdeeritakse. Protsessi käigus elektronidena vabanenud energia salvestatakse elektronide kandjatesse, milleks on koensüümid NADH ja FADH<sub>2</sub>. Viimasena toimub redutseeritud elektronide kandjate oksüdeerimine ning antakse ära prootonid ja elektronid (Garrett ja Grisham 1999; Lehninger *et al.* 2004). Prootonid transporditakse hapniku redutseerimispaika või membraanidevahelisse alasse (Richter ja Ludwig 2003). Elektronid suunatakse mitokondri sisemisel membraanil paiknevasse neljast erinevast ensüümkompleksist koosnevasse hingamisahelasse (joonis 4), mille lõpus kasutatakse neid hapniku veeks redutseerimisel (Garrett ja Grisham 1999; Lehninger *et al.* 2004).

Mitokondri hingamisahel koosneb põhimõtteliselt kindlas järjekorras töötavatest elektronide kandjatest. Enamik neist on transmembraansed valgud, mille hulka kuuluvad ülekannet vahendavad prosteetilised rühmad, kuid on ka selliseid, mis membraani ei läbi. Lisaks NADH-le ja FADH<sub>2</sub>-le kuulub hingamisahela koosseisu teisigi elektronide ülekandega seotud molekule. Koensüüm Q ehk ubikinoon on pika isoprenoidse kõrvalahelaga molekul, mis asub mitokondri membraanis. Ubikinoon on võimeline juurde võtma üks kuni kaks elektroni korraga (tekib vastavalt semikinoonradikaal  $\cdot QH$  või ubikinool QH<sub>2</sub>). Raud-väävel (Fe-S) kompleksi sisaldavad valgud (näiteks hingamisahela I ja II ensüümkompleks) saavad osaleda ühe elektroni ülekandel, seejuures varieerub Fe-iooni oksüdatsiooniaste Fe<sup>3+</sup> ja Fe<sup>2+</sup> vahel. Tsütokroomid on heemi sisaldavad valgud, milles on heemiga seotud Fe-ioon. Elektronide ülekandes muutub raua oksüdatsiooniaste esmalt Fe<sup>3+</sup>-lt Fe<sup>2+</sup>-le ja seejärel tagasi Fe<sup>3+</sup>-le (Smith *et al.* 1997). Tsütokroom *c* (joonis 2) on mitokondri maatriksis lahustuv valk, mis ainsana hingamisahela elektronide kandjatest ei ole seotud mitokondri sisemise membraaniga. Tsütokroomi heemi Fe-ioon on ümbritsetud tsüklilise porfüriiniga. Fe-ioon on porfüriiniga omavahel seotud nelja lämmastikuga tekkiva sideme kaudu (joonis 3). Hingamisahelas leidub veel ka Cu-iooni sisaldavaid elektrone transportivaid valke, mis saavad korraga üle kanda ühe elektroni, mille käigus muutub Cu<sup>2+</sup> Cu<sup>+</sup>-ks ja tagasi (Garrett ja Grisham 1999; Lehninger *et al.* 2004).



**Joonis 2.** Tsütokroom *c*. Joonisel on kujutatud tsütokroom *c* valgu kristallstruktuuri ja selle keskel paiknevat heemi. Fe-iooni ümbritseb tsükliline porfüriin, mille keskel on nelja lämmastikuga seotud Fe-aatom. Fe-aatomi küljes paiknevad veel kaks ligandi – metioniin ja histidiin. Kohandatud. (Wikimedia Commons).



**Joonis 3.** *C*-tüüpi tsütokroomides asuv heem *c*. Fe-iooni ümbritseb tsüklilise struktuuriga porfüriin (roosaga tähistatud ala). Heem *c* on valgustruktuuriga seotud läbi tsüsteiinide tekkinud kahe tioeetersideme (tähistatud sinisega) ning Fe-ioon on seotud nelja lämmastiku abil (Lehninger *et al.* 2004).

Mitokondri hingamisahel (joonis 4) koosneb neljast ensüümkompleksist, millest igaal on oma kindlad funktsioonid. Nendeks kompleksideks on NADH-koensüüm Q reduktaas (I), suksinaat-koensüüm Q reduktaas (II), koensüüm Q-tsütokroom *c* reduktaas (III) ja tsütokroom *c* oksidaas (IV). Kompleks I võtab elektronid NADH-lt vastu, ühendades nii glükolüüsi, tsitraaditsükli kui ka rasvhapete oksüdatsiooni hingamisahelaga. Suksinaatdehüdrogenaas on kandva rolliga ensüümkompleks II koosseisus ning katalüüsib tsitraaditsükklisse kuuluvat reaktsiooni, milles suksinaat oksüdeeritakse fumaraadiks. Nii on tsitraaditsükkel ühendatud hingamisahelaga ka kompleks II kaudu. Komplekside I ja II töö tulemusena tekib redutseeritud koensüüm Q (QH<sub>2</sub>), mis on ühtlasi kompleks III substraat. Kompleks III oksüdeerib QH<sub>2</sub> ja

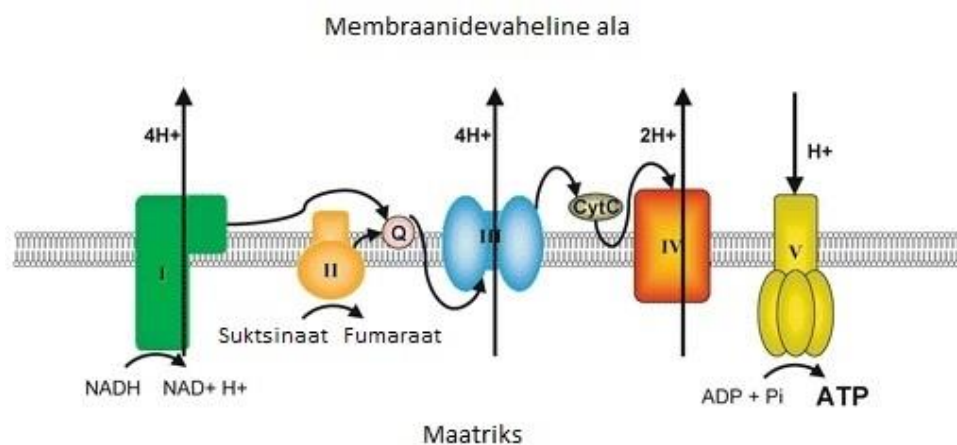


seejärel redutseerib tsütokroom *c*, mis omakorda on substraadiks kompleksile IV. Kompleks IV kannab tsütokroom *c*-lt saadud elektronid üle hapnikule, millest lõpptulemusena tekib vesi (Garrett ja Grisham 1999).

### 1.1.3 Hingamisahela seos oksüdatiivse fosforüleerimisega

Bioloogilistes süsteemides leidub mitu erinevat olulise tähtsusega potentsiaalse energia vormi – keemilistesse sidemetesse salvestatud energia, kontsentratsiooni ning elektrilise potentsiaali gradient. Kusjuures üks energia vorm võib muunduda teiseks vastavalt termodünaamika esimesele seadusele. Mitokondrites kasutatakse keemiliste sidemete lõhkumisel vabanenud energiat prootonite kontsentratsiooni ja elektrilise potentsiaali gradiendi tekitamiseks. See ülesanne lasub hingamisahela ensüümidel, mis lisaks erinevatest allikatest saadavate elektronide ülekandmisele hapnikule tegelevad ka prootonite pumpamisega mitokondri membraanidevahelisse alasse. Elektronide spontaanne ülekanne on võimalik tänu hingamisahelas järjestikuselt võtmerolli mängivate elektronide kandjate reduktsiooni-potentsiaalide kasvule. Elektronide ülekandel vabanenud energia abil võimaldatakse kolmes hingamisahela kompleksis omakorda prootonite transporti maatriksist membraanidevahelisse alasse. Iga elektronpaari hapnikule ülekandmise käigus transpordivad kompleksid I ja III neli prootonit ning kompleks IV kaks prootonit mitokondri maatriksist välja. Nii toimub prootonite kontsentratsiooni ja elektrilise potentsiaali gradiendi tekitamine mitokondri maatriksi ja membraanidevahelise ala vahel (Lodish *et al.* 2000).

Paljud rakusisesed protsessid ei ole energeetiliselt soositud ( $\Delta G > 0$ ) ega toimu spontaanselt. Samas on organismi elutegevuse seisukohalt paljude endergooniliste reaktsioonide kulgemine suure tähtsusega. Sellised reaktsioonid muudetakse võimalikuks piisaval hulgal energiat vabastavate protsesside arvelt (Lodish *et al.* 2003). Just sellise mehhanismi järgi toimub organismides adenosiintrifosfaadi (ATP) süntees ehk oksüdatiivne fosforüleerimine. ATP tootmine adenosiindifosfaadist (ADP) ja anorgaanilisest fosforist ( $P_a$ ) ei ole spontaanne protsess ning muudetakse võimalikuks tänu eelnevalt hingamisahela poolt kontsentratsiooni ja elektrilise potentsiaali gradiendina salvestatud energiale (Casiday *et al.* 2008). ATP-s sisalduv energia vabaneb molekulis leiduva kõrge energiaga fosfoanhüdriidsideme hüdrolüüsil. Seda energiat kasutatakse järgmiste endergooniliste protsesside võimaldamiseks, näiteks valkude ja DNA sünteesiks vastavalt aminohapetest ja nukleotiididest, molekulide transpordiks vastu kontsentratsioonigradiendi, lihaste kokkutõmmeteks jne (Lodish *et al.* 2003).



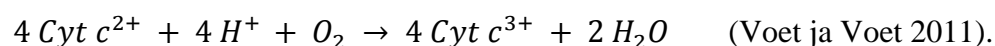
**Joonis 4.** Hingamishela neli kompleksi (I-IV) koos ATP sünteesi katalüüsiva ensüümiga ATP-süntaas (V). Elektronide transpordiga hingamishelas kaasneb prootonite kontsentratsiooni ja elektrilise potentsiaali gradiendi teke, mis võimaldab ATP sünteesi. Q – elektronide kandja koensüüm Q. Cyt *c* – tsütokroom *c* (Cuperus *et al.* 2010).

## 1.2 Hingamishela kompleks IV

### 1.2.1 Tsütokroom *c* oksidaas

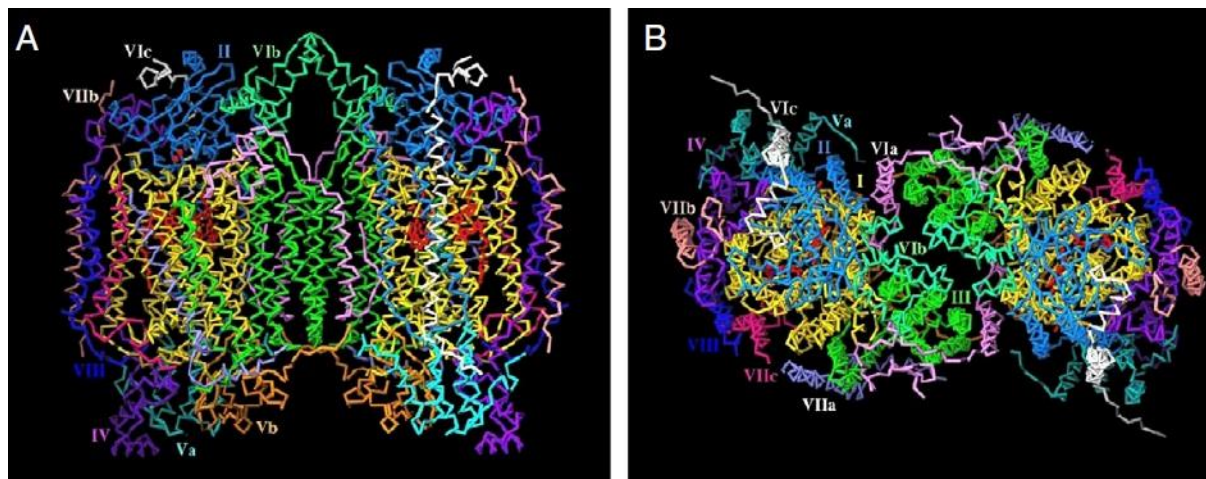
Kuna tsütokroom *c* oksidaas (COX) mängib organismi füsioloogilistes protsessides niivõrd olulist rolli, on ensüümist saanud üks olulisemaid uurimisobjekte bioenergeetika valdkonnas (Tsukihara *et al.* 1996). COX katalüüsib reaktsiooni, mille käigus toimub hapniku redutseerimine veeks (Voet ja Voet 2011).

Üldine tsütokroom *c* oksidaasi poolt katalüüsitud reaktsioon näeb välja järgmine:



COX-i valgustruktuuri uurimisel on põhiliselt kasutatud veistest või bakteritest (*Paracoccus denitrificans* või *Rhodobacter sphaeroides*), kuid ka hobustest eraldatud ensüümi. Eelpool nimetatud bakteritest pärinevate oksidaaside võtmerolli mängivate domäänide (I-III) struktuur on peaaegu identne loomade mitokondrist pärit COX-i struktuuriga (Michel *et al.* 1998; Richter ja Ludwig 2003; Yoshikawa *et al.* 2012).

Üldiselt koosneb COX 13-st erinevast domäänist (joonis 5), millest kolm suuremat (I-III) on kodeeritud mtDNA poolt. Suuremaid domääne ümbritsevad 10 väiksemat, mis on kodeeritud nDNA poolt (Tsukihara *et al.* 1996; Yoshikawa *et al.* 2012). Lisaks kuuluvad COX-i koosseisu seitse fosfolipiidi ja triglütseriidi, neli redoksprotsessidest osavõtvat metallitsentrit ( $\text{Cu}_A$ , heem  $a$  ( $\text{Fe}_a$ ),  $\text{Cu}_B$ , heem  $a_3$  ( $\text{Fe}_{a_3}$ )) ja kolm redoksprotsessidest otseselt mitteosavõtvat metallitsentrit ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ) (Yoshikawa *et al.* 2012). Eukarüootsetes rakkudes esineb COX tavaliselt dimeerse struktuuriga, kuid aktiivne on neist vaid üks monomeer (Voet ja Voet 2011).



**Joonis 5.** Veise südamest eraldatud tsütokroom *c* oksidaasi dimeerne kristallstruktuur. Pildil A on kujutatud ensüüm kõrvaltvaates ning pildil B pealtvaates tsütosooli poolt vaadatuna. Rooma numbritega on tähistatud struktuuri erinevaid domääne (Yoshikawa *et al.* 2012).

Domään I, koosnedes 12-st transmembraansest heeliksist, on COX-i polüpeptiidsetest alamosadest suurim (joonis 5). See paikneb sisemises membraanis omamata seejuures ühtki suuremat maatriksisse või membraanidevahelisse alasse väljaulatuvat osa (Tsukihara *et al.* 1996; Yoshikawa *et al.* 2012). Lisaks polüpeptiidahelatele kuuluvad domään I ehitusse kolm redoksprotsessidest osavõtvat metallitsentrit (heem  $a$ , heem  $a_3$  ja  $\text{Cu}_B$  tsenter). Heem  $a_3$  ja selle vahetus läheduses asuv  $\text{Cu}_B$  moodustavad kahetuumse tsentri, mille abil seotakse ning redutseeritakse hapnik (Richter ja Ludwig 2003).

Kahest transmembraansest heeliksist koosneva domään II mõlemad heeliksid asuvad vastavalt domään I heeliksile IX ja VIII vahetus läheduses (joonis 5). Erinevalt domään I-st on domään II-l membraanist tsütosooli väljaulatuv osa, mis koosneb beeta-silindri moodustanud kümnest niitjast peptiidahelast (Tsukihara *et al.* 1996; Michel *et al.* 1998). Selles osas asub ka viimane redoksprotsessidest osavõttev metallitsenter ( $\text{Cu}_A$ ), mis koosneb kahest tsüsteiini jäägiga ühendatud Cu-ioonist (Yoshikawa *et al.* 2012).

Domään III (joonis 5) asub täielikult sisemises membraanis ning paikneb domään I kõrval omamata kontakti domään II-ga. Domään koosneb seitsmest transmembraansest heeliksist, mis on jagunenud kahte kimpu. Esimene kimp koosneb kahest ja teine viiest heeliksist ning nende vahel on V-kujuline lõhe (Tsukihara *et al.* 1996). Kuna domään III ei sisalda endas redoksprotsessidesse kaasatud metallitsentreid ega osale metallide sidumises ensüümiga, on selle täpne otstarve siiani selgusetu (Michel *et al.* 1998). Siiski on välja toodud mõned võimalikud funktsioonid – tegu võib olla ehitusliku tähtsusega või hapnikku teed aktiivtsentrini rajava ensüümi domääniga (Michel *et al.* 1998; Yoshikawa *et al.* 2012).

Kümme väiksemat domääni ümbritsevad kolme suuremat ja olulisemat, olles arvatavasti tähtsal kohal terve ensüümi stabiilse konformatsiooni säilitamisel. Kuigi nende täpsem funktsioon on seni teadmata, on praeguseks nende struktuur kindlaks tehtud (Richter ja Ludwig 2003; Yoshikawa *et al.* 2012).

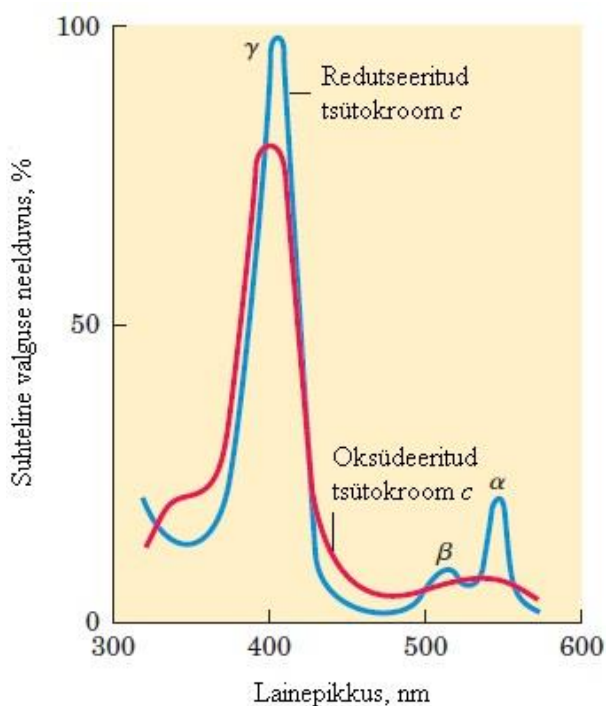
### 1.2.2 Tsütokroom *c*

C-tüüpi tsütokroomid on väikesed globulaarse struktuuriga valgud, mille koostisesse kuuluvad kovalentselt seotud heemid. Need heemid on valgustruktuuriga seotud läbi kahe tsüsteiini tekkinud tioeetersideme (joonis 3) ning neid sisaldavate valkude ülesanneteks on muuhulgas hapniku sidumine, elektronide transport, signaaliülekanne ning katalüsaatori roll. Heemi Fe-inoonid omavad tavaliselt kahte porfüriini tsüklist moodustunud tasapinnaga risti paiknevat ligandi, millest üks on histidiin ning teine histidiin või metioniin. Metioniini leiab eelkõige mitokondri tsütokroom *c* (joonis 2) ehitusest (Stevens *et al.* 2004; Voet ja Voet 2011).

Eukarüootsete organismide mitokondrites leiduv tsütokroom *c* on globulaarse struktuuriga valk, mis koosneb enamasti rohkem kui 100-st aminohappest. Kogu valgu molekulmass on seejuures ligikaudu 12,5 kDa. Heem asub tsütokroom *c* keskpaiga läheduses ja on ümbritsetud peamiselt hüdrofoobsete aminohapetega (Garrett ja Grisham 1999). Paiknedes mitokondri membraanidevahelises alas on tsütokroom *c* peamine roll elektronide transport hingamisahela kompleksilt III kompleksile IV (Sanishvili *et al.* 1995). Seostumine sisemises membraanis asuvate ensüümidega toimub peamiselt tänu elektrostaatilistele interaktsioonidele (Lehninger *et al.* 2004). Elektronide transportimise ajal varieerub tsütokroom *c* heemi Fe-iooni oksüdatsiooniaste  $\text{Fe}^{2+}$  ja  $\text{Fe}^{3+}$  vahel (Pettigrew ja Moore 1987). Elektronide ülekandmisel on abiks metioniini kõrvalahel, mis stabiliseerib raua  $\text{Fe}^{2+}$  olekut ning muudab selle reduktsioonipotentsiaali positiivsemaks, kui see *c*-tüüpi tsütokroomidel tavaliselt on. Nimelt

võib nende tsütokroomide, mille metioniini kõrvalahela asemel on histidiini kõrvalahel, reduktsioonipotentsiaal olla kuni -400 mV. Metioniini olemasolu võib potentsiaali väärtuse tõsta aga u +250 mV lähedusse (Stevens *et al.* 2004).

Tänu rauda sisaldavatele heemidele on tsütokroomidele omane tugev neelduvus nähtava valguse alas. Igal redutseeritud vormis tsütokroomil ( $\text{Fe}^{2+}$ ) on kindlas lainepikkuste vahemikus kolm piiki, v.a tsütokroom *a*-1, millel on neid vaid kaks. Piigid jäävad üldjuhul lainepikkuste vahemikku 600-415 nm. Tsütokroom *c* neeldumismaksimumid on piikide  $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$  juures vastavalt 550, 531 ja 415 nm läheduses (joonis 6) (Smith *et al.* 1997; Lehninger *et al.* 2004). COX-i aktiivsuse mõõtmine antud töös tugineski tsütokroom *c* neelduvuste erinevustele oksüdeeritud ja redutseeritud vormi vahel  $\alpha$ -piigi juures (joonis 6). Redutseeritud tsütokroom *c* viiakse kokku COX-iga, mis oksüdeerib tsütokroom *c*. Oksüdeeritud tsütokroom *c* neelduvus samal lainepikkusel on oluliselt väiksem kui redutseeritud vormil.



**Joonis 6.** Tsütokroom *c* absorptsioonispekter. Redutseeritud vormi neelduvus on kujutatud sinise ja oksüdeeritud vormi neelduvus punase joonega.  $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$  tähistavad redutseeritud vormile iseloomulikke piike.  $\alpha$ -piigi juures lainepikkusel 550 nm on redutseeritud ja oksüdeeritud vormis tsütokroom *c* neelduvuste erinevused kõige lihtsamini eristatavad (Lehninger *et al.* 2004).

Lisaks elektronide ülekandja rollile hingamisahela komplekside III ja IV vahel on tsütokroom *c*-l veel teinegi oluline ülesanne täita. Kui rakuni jõuab apoptootiline stimulatsioon, mille alla kuulub näiteks info kahjustatud DNA-st, metaboolsest stressist või voltumata valkude olemasolust, siis vabastatakse tsütokroom *c* tsütosooli. See omakorda vallandab apoptoosi ehk programmeeritud rakusurma (Ow *et al.* 2008).

### 1.2.3 Elektronide ja prootonite transport hingamisahelas

Nii elektronide ülekandemehhanismi kui ka sellega kaasnevat prootonite transportimist hapniku redutseerimispaika ning membraanidevahelisse alasse on uuritud erinevate meetoditega, sh mutagenees, röntgenstruktuuranalüüs, NMR jne (Richter ja Ludwig 2003; Sakamoto *et al.* 2011; Yoshikawa *et al.* 2011). Siiani ei ole aga teadlaste poolt suudetud päris ühest teooriat mehhanismi seletamiseks leida. Siiski leidub erinevates avaldatud teadusartiklites ühiseid jooni (Lucas *et al.* 2011; Sakamoto *et al.* 2011).

Elektronide liikumine ühelt elektronide kandjalt teisele on võimalik tänu ülekandest osavõtivate poolreaktsioonide positiivsele standardsete reduktsioonipotentsiaalide vahele, mille puhul on vaba energia muutus negatiivne ( $\Delta G < 0$ ) ja reaktsioon toimub spontaanselt (Voet ja Voet 2004). Elektronide ülekanne algab COX-i II-st domäänist, kuhu seostub redutseeritud tsütokroom *c*. Seostumisel on olulisel kohal elektrostaatilised ning hüdrofoobsed vastasmõjud (Michel *et al.* 1998; Maneg *et al.* 2003; Richter ja Ludwig 2003; Sakamoto *et al.* 2011;). II domääni Cu<sub>A</sub> tsentri ümber paiknevad negatiivselt laetud aminohapped, mis interakteeruvad tsütokroom *c* heemi ümbritsevate positiivselt laetud aminohapetega (peamiselt lüsiin ja arginiin) (Maneg *et al.* 2003; Richter ja Ludwig 2003). Seostumisele aitavad kaasa ka hüdrofoobsed vastasmõjud, mis on põhjustatud Cu<sub>A</sub> tsentri ümber paiknevate hüdrofoobsete aromaatsete aminohapete (trüptofaan, türosiin, fenüülalaniin) ja tsütokroom *c* heemi ümber olevate hüdrofoobsete osade vaheliste interaktsioonide poolt (Maneg *et al.* 2003; Richter ja Ludwig 2003; Sakamoto *et al.* 2011). Üheselt ei ole veel teada, kumb välja toodud vastasmõjudest on domineeriv ning kumb nõ viimistleb tekkivat kompleksi ja parandab elektroni ülekande tõhusust (Sakamoto *et al.* 2011). Arvatakse, et just tsütokroom *c* ja COX-i vahelise kompleksi moodustumine on nendevahelise ensüümreaktsiooni kiirust piiravaks staadiumiks (Michel *et al.* 1998).

Pärast tsütokroom *c* seostumist COX-iga kandub elektron tsütokroom *c*-lt Cu<sub>A</sub> tsentrisse. Seda tänu domään II pinnal paiknevale trüptofaanile, mille tähtsus on kindlaks tehtud valgu

aminohappelise koostise muutmisega (koht-spetsiifiline mutagenees). Kuigi täpne funktsioon ei ole teada, arvatakse, et selle olemasolu on vajalik steerilistel põhjustel (Maneg *et al.* 2003; Richter ja Ludwig 2003). Cu<sub>A</sub> tsentrist liigub elektron edasi heem *a*-le, kusjuures on leitud, et ülekandeteekonna moodustab 14 kovalentset sidet ja kaks vesiniksidet (Iwata *et al.* 1995; Michel *et al.* 1998). Samas on välja toodud võimalus, et elektron kantakse Cu<sub>A</sub> tsentrist otse heem *a*<sub>3</sub>-le. Cu<sub>A</sub> kaugus heem *a*<sub>3</sub>-st on aga võrreldes kaugusega heem *a*-st suurem. Seetõttu ei peeta sellist elektroni ülekannet väga tõenäoliseks, kuid samas ka ei välistata (Michel *et al.* 1998; Richter ja Ludwig 2003). Heem *a* on elektroni doonoriks heem *a*<sub>3</sub> ja Cu<sub>B</sub> kahetuumsele metallitsentrile. Kuigi distants heem *a* raua ja heem *a*<sub>3</sub> raua aatomite vahel on võrdlemisi suur, lahutab heemide ääri tänu Fe-ioone ümbritsevatele tsüklilistele porfüriinidele oluliselt väiksem vahemaa. Tõenäoliselt just seetõttu on elektronide ülekanne heemilt heemile võimalik. Lisaks võivad tee elektronide transpordiks rajada Fe-aatomite ligandid (nt porfüriini tsükliga risti paiknev histidiin) või polüpeptiidide ahelad (Michel *et al.* 1998).

Iga hapnikumolekuli redutseerimiseks võetakse maatriksist kokku kaheksa prootonit – pool neist transporditakse hapniku redutseerimispaika ning pool pumbatakse membraanidevahelisse alasse prootonite gradiendi tekitamiseks (Richter ja Ludwig 2003). Kuigi on pakutud välja variant, et prootonite pumpamise mehhanism ei ole seotud elektronide transpordiga erinevate metallitsentrite vahel COX-is, vaid pigem konformatsiooniliste muutustega, kinnitavad siiski enamus töös kasutatud allikatest vastupidist (Belevich *et al.* 2006). Aja jooksul on põhjalikult ja korduvalt erinevate teadusgruppide poolt uuritud, milliste astmete juures täpselt toimub prootonite ülekanne elektronide transportimise protsessi vältel, kuid ühisele arusaamale ei ole senini jõutud (Richter ja Ludwig 2003).

Erinevate analüüsimeetoditega on kindlaks tehtud prootonite ülekanderajad COX ensüümis. Heem *a*<sub>3</sub> ja Cu<sub>B</sub> poolt moodustatud hapniku redutseerimise tsenter on ühendatud kahe eraldiseisva prootonite transportimise teega, mida nimetatakse K- ja D-teerajaks. Need rajad saavad alguse maatriksipoolsest osast ning funktsioneerivad hapnikuga seotavate prootonite transpordikanalitena. Lisaks esineb COX-is veel kolmas rada, mida nimetatakse H-teerajaks. See paikneb heem *a* läheduses ja osaleb prootonite pumpamisel maatriksist membraanidevahelisse alasse. Seda funktsiooni täidab osaliselt ka D-teerada. Nii K-, D- kui ka H-rada asub COX-i domäänides I ja II (Yoshikawa *et al.* 2011). Röntgenstruktuuranalüüsi abil on leitud, et nimetatud prootonite transporditeerajad on ümbritsetud hüdrofoobse valgukeskkonnaga ning koosnevad hüdrofiilsetest aminohapetest ja vee molekulidest, mis on omavahel seotud vesiniksidemetega, võimaldades nii prootonitel molekulilt molekulile

liikumist (Richter ja Ludwig 2003). Siiani ei ole aga kindlaks tehtud, millised ja millises ulatuses konformatsioonilised muudatused on vajalikud võimaldamaks prootonite transportimist (Yoshikawa *et al.* 2011).

### 1.3 Hingamisahela häiretega seotud haigused

Mitokondris esinevate häiretega seotud tõved võivad avalduda igas vanuses inimestel. Haiguste põhjustajaks on hingamisahela osade ebakorrapärane talitlus, mida tekitavad patogeensed mutatsioonid hingamisahela ensüümide aminohappelist järjestust kodeerivas DNA-s. Kuna need ensüümid on kodeeritud kahe erineva DNA – nDNA või mtDNA – poolt, siis on säärased tõved geneetiliselt väga keerulised. Mõnel juhul mõjutavad sel viisil tekkinud haigused ühte kindlat organit, suurem osa aga põhjustab defekte samaaegselt mitme organi töös. Peamiselt esinevad häired lihaste, aju ja südame kudedes (Pecina *et al.* 2004; Chinnery 2010).

Kuna COX on imetajate energiatootmise protsessis olulise rolliga ensüüm, põhjustavad sellega seotud patogeensed mutatsioonid ning mutatsioonide tagajärjel tekkiv ensüümi vähenenud aktiivsus või puudujääk tihti tõsisemaid metaboolseid häireid. (Pecina *et al.* 2004). Mõningaid näiteid COX-i häiretega seotud haigustest: LHON (*Leber's hereditary optic neuropathy*) (sümptomid: tugevad nägemishäired), MELAS (*mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes*) (sümptomid: dementsus, piimhappe teke veres, ajutised lokaalsed halvatused), Leigh' sündroom (sümptomid: lihaste kärbumine, tasakaalu- ja kõnehäired) (Shoubridge 2001; Bratton *et al.* 2003).

Lisaks juba väljatoodud haigustele on COX-i aktiivsuse vähenemisega seotud Alzheimeri, Parkinsoni ja Huntingtoni tõbi ning skisofreenia (Harro *et al.* 2011). Samuti on vähirakkudes leitud, et nDNA ja mtDNA poolt kodeeritud ensüümi alamosade omavaheline suhe on võrreldes tavapärasega suurenenud. Seda muutust kasutatakse vähi leviku diagnoosimiseks ja jälgimiseks organismis nii enne kui pärast ravi ning seetõttu arvatakse, et COX-i aktiivsuse määramisest võiks olla palju abi ka vähihaigete seisundi jälgimisel (Murray *et al.* 2007). Ka depressiooni puhul on leitud seoseid COX-i funktsioneerimise häiretega ning antud teemal tehakse uurimistööd Tartu Ülikooli Psühholoogia Instituudi psühhofüsioloogia töögrupis (Harro *et al.* 2011).

Kuna hingamisahela ja selle ensüümide tegevuse puudulikkus on paljude mitokondri haiguste põhjustajaks, siis vastavate ensüümide aktiivsuste määramisel oleks võimalik kiirelt ja küllaltki lihtsalt neid haigusi diagnoosida või nende kulgu jälgida (Murphy *et al.* 2012).



## 1.4 Spektrofotomeetriline meetod ensüümikineetika uurimiseks

Ensüümikineetika uurimiseks kasutatakse tihti peale spektroskoopilisi meetodeid (eriti absorptsioonspektroskoopiat), kuna sel viisil saab lihtsalt uurida ensüümreaktsioonide kulgu ajas. Selliste reaktsioonide puhul on oluline kasutatava(te) aine(te) neelduvuse muutus reaktsiooni käigus. Nii on võimalik jälgida substraadi kontsentratsiooni vähenemist või produktide kontsentratsiooni kasvu määrates mingil kindlal lainepikkusel või lainepikkuste vahemikul neelduvuse muutust (Bisswanger 2002).

Neelduvuse mõõtmise põhimõte seisneb selles, et molekuli neelduvus mingil kindlal lainepikkusel (või vahemikul) on seotud selle kontsentratsiooniga lahuses. Seda seost iseloomustab Lambert-Beer'i seadus, mis kirjeldab ette antud lainepikkusel  $\lambda$  valguse intensiivsuse kahanemist pärast valgust neelavat komponenti sisaldava lahuse läbimist:

$$I = I_0 e^{-\epsilon dc}, \quad (1)$$

kus  $I_0$  ja  $I$  tähistavad valguskiire intensiivsust vastavalt enne ja pärast proovi läbimist,  $d$  näitab kiire poolt läbitud optilise tee pikkust ja  $\epsilon$  on molaarne absorptsioonikoefitsient ( $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).  $I/I_0$  suhe on defineeritud kui läbitavus ja seda väljendatakse tavaliselt protsentides. Eelpool esitatud valemist (1) on näha, et valguse intensiivsus väheneb eksponentsiaalselt koos valgust neelava aine vähenemisega. Lineaarselt iseloomustab seda sõltuvust negatiivne logaritm läbitavusest:

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon dc. \quad (2)$$

$A$  tähistab valemis (2) neelduvust (Copeland 2000; Bisswanger 2002).

## 1.5 COX-i aktiivsuse määramine

Tänapäeval on üheks levinumaks COX-i aktiivsuse määramise viisiks spektrofotomeetriline meetod, mille puhul määratakse küvetis COX-i substraadi tsütokroom  $c$  neelduvuse muutust ajas lainepikkusel 550 nm. Sellise meetodi puuduseks on suur ajaline ja materiaalne kulu. Seda eriti juhtudel, kus on vaja COX-i aktiivsust määrata suures hulgas bioloogilistes proovides, sest üldjuhul saab neelduvust samaaegselt mõõta vaid ühes küvetis korraga.

Praeguseks on juba välja töötatud ja publitseeritud meetod, milles kasutatakse ensüümi aktiivsuse määramiseks plaadilugejat ja 96 süvendiga katseplaati (Murray *et al.* 2007). Antud

meetodi puuduseks on asjaolu, et eelnevalt on vajalik ensüümi siduvate antikehade kinnitamine katseplaadile. See aga suurendab oluliselt nii meetodi raskusastet kui ka materiaalselt kulu.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja töötada meetod plaadilugejaga 96 süvendiga katseplaadil COX-i aktiivsuse määramiseks roti ajukoes, mis võrreldes üldlevinud spektrofotomeetrilise meetodiga oleks nii vähem aeganõudev kui materiaalselt vähem kulukas. Plaadilugejaga teostatava meetodi põhimõtte tugineks sarnaselt spektrofotomeetrilisele meetodile neelduvuse muutuse uurimisele ajas ning võimaldaks registreerida COX-i kontsentratsiooniga seoses oleva tsütokroom *c* kontsentratsiooni muutust lahuses. Töö peamiseks ajendiks oli Tartu Ülikooli Psühholoogia Instituudi psühhofüsioloogia töögrupi huvi määrata korraga paljude katseloomade ajude eri struktuurides COX-i aktiivsust uurimaks oksüdatiivse metabolismi ja depressiooni vahelisi seoseid erinevates loomudelites.

## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Materjalid ja metoodika

#### 2.1.1 Aparatuur ja töövahendid

*Materjalid:* Hobuse südamekoest eraldatud tsütokroom *c* oksüdeeritud vorm pärineb firmalt Sigma, redutseerija ditiotreitol (DTT) ja oksüdeerija punane veresool ehk  $K_3[Fe(CN)_6]$  pärinevad firmalt AppliChem, detergent *n*-dodetsüül- $\beta$ -D-maltoos firmalt Sigma, dikaaliumvesinikfosfaat ja kaaliumdivesinikfosfaat pärinevad firmalt AppliChem, Dulbecco's fosfaatpuhverdatud saliin ehk DPBS pärineb firmalt PAA Laboratories GmbH, filtreerimisgeel Sephadex G-50 firmalt Pharmacia Fine Chemicals AB, plastikust geel-filtratsiooni kolonn firmalt Biorad, klaasist ja plastikust 1 cm laiusega küvetid firmalt PerkinElmer, 96 süvendiga lamedapõhjaline katseplaat firmalt Brand, roti ajukude (*dorsal raphe* ja *hypothalamus*) saadi prof. J. Harro psühhofüsioloogia töögrupilt TÜ Psühholoogia Instituudist.

*Seadmed:* Plaadilugeja Pherastar firmalt BMG Labtech, spektrofotomeeter UV-1800 firmalt Shimadzu, spektrofotomeeter NanoDrop 1000 firmalt Thermo Scientific, koe homogenisaator firmast Omni Int.

#### 2.1.2 Tsütokroom *c* töölahuse valmistamine

*Meetod 1:* Valmistati 230 mg/ml kontsentratsiooniga oksüdeerunud tsütokroom *c* lahuse eelnevalt dikaaliumvesinikfosfaadist ja kaaliumvesinikdifosfaadist tehtud 10 mM fosfaatpuhveris (pH 7,4) või DPBS-is. Tsütokroom *c* redutseerimiseks lisati liias 1 M DTT-d kuni 45 mM kontsentratsiooni saavutamiseni ja inkubeeriti saadud lahust toatemperatuuril 5 min. Seejärel määrati NanoDrop spektrofotomeetriga 1  $\mu$ l lahuses neelduvused lainepikkusel 550 nm ja 565 nm ning arvutati  $A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}$  suhe. Üle 10-ne suhte korral liiguti edasi järgmise etapi juurde, kui aga suhe oli alla 10-ne, siis lisati tsütokroom *c* lahusele veel 25 kuni 50  $\mu$ l 1 M DTT lahust, segati ja lasti inkubeeruda 5 min toatemperatuuril ning määrati uuesti  $A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}$  suhe. Seda etappi korrati kuni  $A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}$  suhe oli üle 10-ne. Järgmisena teostati redutseeritud tsütokroom *c* lahuse puhastamine üleliigsest redutseerijast DTT, milleks kasutati geel-filtreerimist läbi Sephadex G-50 geeliga täidetud kolonni. Elueerimispuhvriks oli 10 mM kaaliumfosfaatpuhver (pH 7,4). Korruga filtreeriti kuni 200  $\mu$ l redutseeritud tsütokroom *c* lahust ning filtreerimisel koguti tsütokroom *c* punase lahuse kolonnist väljumisest alates kuni 25 tilka

1,5 ml tuubi. Filtreeritud tsütokroom *c* lahuse puhtust redutseerijast kontrolliti spektrofotomeetrilisel meetodil, nagu on soovitatud Spinazzi *et al.* 2012. Vastavalt nimetatud artiklile valmistati kogutud tsütokroom *c* fraktsiooni põhjal töölahus DPBS-is, milles tsütokroom *c* kontsentratsioon oli ~2 mg/ml ning sisaldas lisaks 0,05 % *n*-dodetsüül- $\beta$ -D-maltoosi. Saadud töölahust lisati 2 ml küveti ja asetati 3 min 37°C juurde eelinkubeerima. Seejärel mõõdeti Shimazu UV-1800 spektrofotomeetriga  $550 \pm 0,1$  nm juures neeldumise intensiivsuse muutust iga minuti tagant 2 kuni 3 minuti jooksul. Edasi lisati küveti väike kogus oksüdeerijat ning jälgiti neelduvust  $550 \pm 0,1$  nm juures 2 kuni 3 minutit. Kui neelduvus mõõtmiste vältel ei muutunud rohkem kui 0,005 ühikut minutis ning  $A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}$  suhe oli algselt suurem kui 6, loeti lahus töökõlblikuks.

**Meetod 2:** Valmistati 7 mg/ml kontsentratsiooniga oksüdeeritud tsütokroom *c* lahus 10 mM fosfaatpuhvris (pH 7,4) või DPBS-is, millele lisati moolide poolest võrdses koguses DTT-d, segati ja inkubeeriti 5 min toatemperatuuril. Järgmisena määrati 1  $\mu$ l lahuses NanoDrop spektrofotomeetriga  $A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}$  suhe ning kui see oli üle 10-ne, asuti järgmise etapi juurde. Kui  $A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}$  suhe oli alla 10-ne, lisati veel 25 kuni 50  $\mu$ l 10 mM DTT lahust, inkubeeriti 5 min ja määrati  $A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}$  suhe uuesti. Seda etappi korrati kuni  $A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}$  suhe oli üle 10-ne. Selle meetodi puhul ei teostatud geel-filtratsiooni, vaid asuti kohe tsütokroom *c* lahuse töökõlblikkust kontrollima spektrofotomeetriselt, nagu kirjeldatud meetodis 1. Spektrofotomeetriga kontrolli läbi viimiseks valmistati esialgsest tsütokroom *c* lahusest töölahus, mille kontsentratsioon oli 1,04 mg/ml. Ka see lahus sisaldas veel 0,05 % *n*-dodetsüül- $\beta$ -D-maltoosi.

## **2.1.3 COX-i aktiivsuse määramine**

### **2.1.3.1 Koe homogeniseerimine ja töölahuse valmistamine**

Roti ajukoe (nii *dorsal raphe* kui *hypothalamus* puhul) töölahuse valmistamiseks kaaluti -80°C juures säilitatud kude ja homogeniseeriti jääkülmas DPBS-is kaal/ruumala suhtega 1:39-le. Saadud homogenaadist valmistati järgnevad lahjendused nii, et koe lõpplahjendus reaktsioonikeskkonnas oli vastavalt 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 ja 5000 korda. Vahetult enne mõõtmist lisati jääl hoitud ajukoe vastavale lahjendusele 19:1-le (roti ajukoe kaal/detergent) suhtes 1 %-list *n*-dodetsüül- $\beta$ -D-maltoosi lahust, segati ja inkubeeriti 3 min 37°C juures, pärast mida teostati COX-i aktiivsuse määramine kas spektrofotomeetri või plaadilugejaga.

### 2.1.3.2 Mõõtmised spektrofotomeetriga

Redutseeritud tsütokroom *c* autooksüdatsiooni mõõtmiseks lisati plastikküveti 450 µl 1,04 mg/ml kontsentratsiooniga tsütokroom *c* lahust ja asetati 3 min 37°C juurde inkubeerima. Seejärel lisati küveti 150 µl 0,05 %-list *n*-dodetsüül-β-D-maltoosi lahust DPBS-is, segati ja mõõdeti 4 min jooksul 37°C juures neelduvust lainepikkusel 550 ± 0,1 nm.

COX-i aktiivsuse mõõtmiseks valmistati eelpool kirjeldatud (vt ptk 2.1.3.1) meetodil roti ajukoe töölahus vastava lahjendusega, lisati 19:1 suhtes 1 %-list *n*-dodetsüül-β-D-maltoosi DPBS-is, segati ja asetati inkubeerima 3 min 37°C juurde. Seejärel lisati plastikküveti 450 µl tsütokroom *c* töölahust ja inkubeeriti 3 min 37°C juures. Kolme minuti möödudes lisati roti ajukoe töölahusest 150 µl tsütokroom *c* töölahusele, segati ja mõõdeti neelduvust lainepikkusel 550 ± 0,1 nm 4 min jooksul 37°C juures.

### 2.1.3.3 Mõõtmised plaadilugejaga

Plaadilugeja jaoks tsütokroom *c* neelduvuse mõõtmiseks sobiva filtri valimiseks teostati eelnevalt mõõtmised erinevate läbilaskvusomadustega filtritega. Selleks lisati katseplaadi vastavatesse süvenditesse 300 µl redutseeritud tsütokroom *c* lahust, 300 µl oksüdeeritud tsütokroom *c* lahust ja 300 µl DPBS-lahust (*blank*) ning mõõdeti nende süvendite neelduvusi kasutades erinevate omadustega filtreid.

COX-i aktiivsuse määramiseks valmistati eelpool toodud lahjendustega ajukoe töölahused (vt ptk 2.1.3.1) ja hoiti jääl kuni detergendi lisamiseni ja eelinkubeerimiseni. Vahetult enne inkubeerima panekut ja ajukoe erinevate lahjenduste kandmist katseplaadile lisati ajukoe lahustele detergendi (vt ptk 2.1.3.1) ning kanti seejärel katseplaadi süvenditesse. Samale katseplaadile lisati ka autooksüdatsiooni mõõtmiseks 0,05 %-st *n*-dodetsüül-β-D-maltoosi lahust DPBS-is. Kokku täideti katseplaadil 8 süvendit. Katseplaat asetati seejärel 3 min 37°C juurde inkubeerima. Teise katseplaadi vastavatesse 8-sse süvendisse kanti 225 µl tsütokroom *c* töölahust kontsentratsiooniga 1,04 mg/ml ja *blank*-mõõtmisteks 300 µl DPBS-puhvrit. Katseplaat asetati seejärel 3 min 37°C juurde eelinkubeerima. Pärast inkubeerimist lisati 75 µl erinevate lahjendustega ajukoe töölahust ensüümi aktiivsuse mõõtmiseks või 0,05 %-st *n*-dodetsüül-β-D-maltoosi lahust DPBS-is autooksüdatsiooni mõõtmiseks vastavatesse tsütokroom *c*-d sisaldavatesse süvenditesse, segati ja mõõdeti neelduvust 545 ± 10 nm lainepikkusel 4 min 37°C juures.

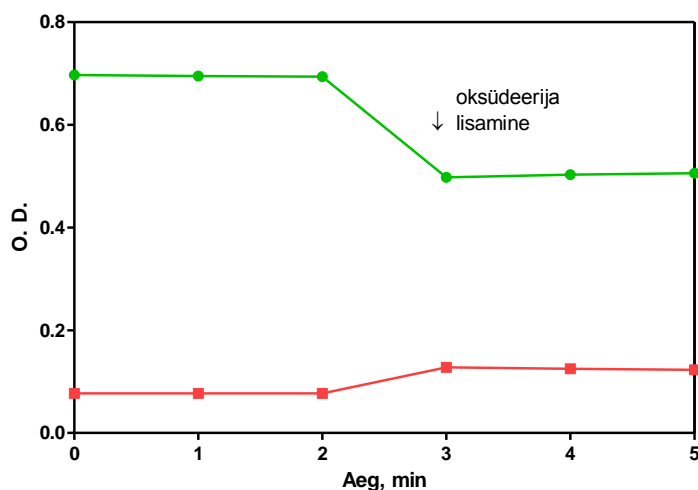
#### **2.1.4 Andmete analüüs**

Tehtud katsete tulemuste analüüsiks ning graafiliseks esitamiseks kasutati andmetöötlusprogrammi GraphPad Prism™ 4.03 (GraphPad Software Inc.). Tulemused on esitatud kui triplikaatide keskmised  $\pm$  SEM (*Standard Error of Mean* ehk keskmise standardhälve), v. a. juhtudel kui joonise allkirjas või tabeli pealkirjas on kirjeldatud teisiti. Kõiki olulisemaid katsed teostati vähemalt 2 korda.

### 3 TULEMUSED JA ARUTELU

#### 3.1 Redutseeritud tsütokroom *c* puhtuse kontrollimine

Enne põhikatsete tegemist kontrolliti eelnevalt valmistatud tsütokroom *c* töölahuste puhtust redutseerijast, mille juuresolek segaks COX-i aktiivsuse määramist. Redutseerija olemasolu määrati viisil nagu on soovitatud Spinazzi *et al.* 2012. Joonisel 7 on esitatud meetodil 1 valmistatud tsütokroom *c* töölahuse  $A_{550\pm 0,1\text{ nm}}$  intensiivsuse muutus ajas, mis püsis nii enne kui pärast oksüdeerija lisamist soovitatud piires ega muutunud üle 0,005 neelduvuse ühiku minutis.  $A_{550\pm 0,1\text{ nm}}$  intensiivsuse stabiilsus ajas pärast oksüdeerija (punane veresool) lisamist teise ja kolmanda minuti vahel näitab, et tsütokroom *c* töölahuses pole enam olulist redutseerivat aktiivsust. Tulemused olid sarnased ka meetodil 2 valmistatud tsütokroom *c* töölahuse puhul.



**Joonis 7.** Redutseeritud tsütokroom *c* lahuse redutseerijast puhtuse kontroll. Esitatud on vastavalt  $A_{550\text{ nm}}$  (●) ja  $A_{565\text{ nm}}$  (●) neelduvused. Mõõtmised teostati singlikaatidena.

Samuti olid soovitatud normi piires tsütokroom *c* töölahuste  $A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}$  suhte väärtused, mis nii meetodil 1 kui ka 2 valmistatud tsütokroom *c* töölahuste puhul olid selgelt üle 6 (tabel 1). Antud tulemused näitavad, et mõlemal meetodil valmistatud tsütokroom *c* töölahused olid katseteks täiesti sobivad.

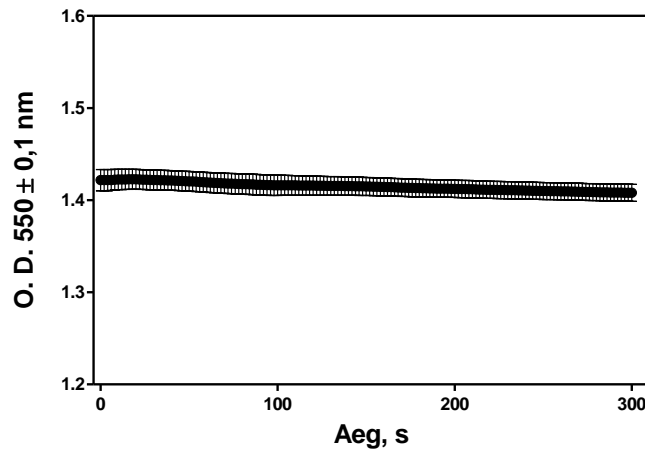
**Tabel 1.** Meetodil 1 ja 2 valmistatud tsütokroom *c* töölahuste  $A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}$  suhted.

Aeg, min	Meetod 1		Meetod 2	
	Oksüdeerija	$A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}$	Oksüdeerija	$A_{550\text{ nm}}/A_{565\text{ nm}}$
0	-	9,04	-	12,1
1	-	9,02	-	12,1
2	-	8,98	-	12,1
3	+	3,9	-	12,1
4	+	4,04	+	4,6
5	+	4,11	+	4,6
6			+	4,6
7			+	4,7

### 3.2 Tsütokroom *c* autooksüdatsioon

Spektrofotomeetriliselt määrati tsütokroom *c* töölahuse autooksüdatsiooni ulatust eesmärgiga teha kindlaks, kas õhuhapniku põhjustatud autooksüdatsioon võib oluliselt segada COX-i aktiivsuse määramist. 5 minuti jooksul 37°C juures muutus tsütokroom *c* töölahuse  $A_{550\pm0,1\text{ nm}}$  näit 0,014 ühikut ehk alla 1 % (joonis 8), mis võrreldes antud töö raames tehtud kõige lahjema ajukoe lahuses (5000x) sisalduva COX-i poolt põhjustatud muutusega on 46 korda väiksem. Seega võib kindlalt öelda, et tsütokroom *c* töölahuses 37°C juures toimuv autooksüdatsioon ei sega COX-i aktiivsuse määramist oluliselt.

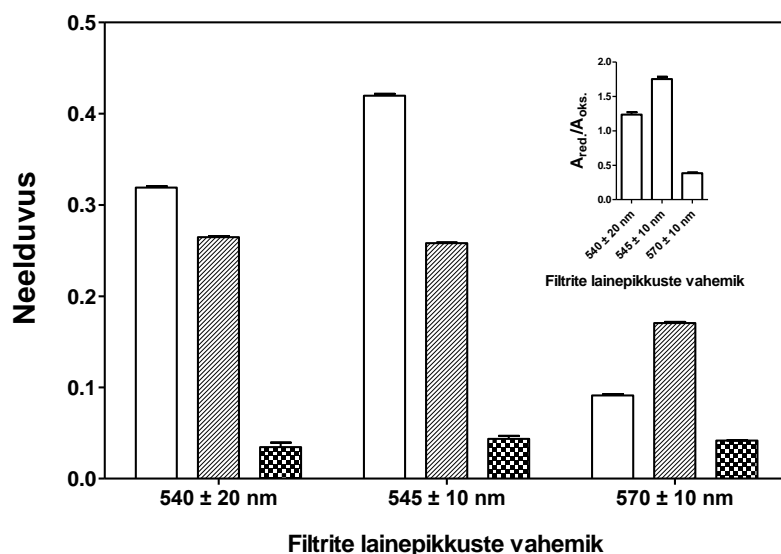




**Joonis 8.** Redutseeritud tsütokroom *c* autooksüdatsioon töölahuses 37°C juures. Esitatud on triplikaatide keskmine  $\pm$  SEM.

### 3.3 Plaadilugejale optimaalse filtri valimine

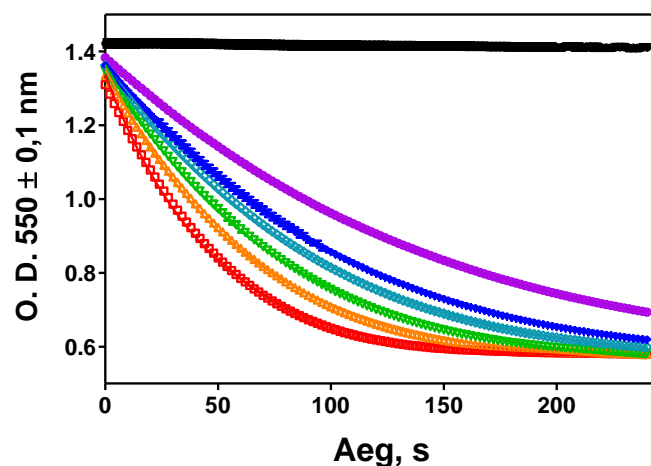
Leidmaks plaadilugeja olemasolevate filtrite seast optimaalne filter COX-i aktiivsuse määramiseks, mõõdeti redutseeritud ja oksüdeeritud tsütokroom *c* lahuste neelduvused plaadilugejaga kasutades erinevaid filtreid. Redutseeritud tsütokroom *c* lahuse neelduvus oli suurim  $545 \pm 10$  nm läbilaskvusega filtri puhul ning madalaim  $570 \pm 10$  nm läbilaskvusega filtri puhul (joonis 9). Oksüdeeritud tsütokroom *c* lahuse neelduvus oli suhteliselt sarnane kõikide proovitud filtrite puhul ning sama tulemus saadi *blank*-lahuse (DBPS-lahus) puhul (joonis 9). Filtri valimisel lähtuti redutseeritud ja oksüdeeritud tsütokroom *c* vormide neelduvuste suhte  $A_{\text{red.}}/A_{\text{oks}}$  suurusest. Antud filtrite puhul (joonisel 9 asuv sisendgraafik) oli kõige suurem  $A_{\text{red.}}/A_{\text{oks}}$  väärtus (1,75)  $545 \pm 10$  nm läbilaskvusomadustega filtri puhul ning edaspidisteks katseteks valitigi see filter.



**Joonis 9.** Redutseeritud ja oksüdeeritud tsütokroom *c* lahuste neelduvused erinevate filtrite puhul. Suuremal graafikul on esitatud redutseeritud (tühj tulp) ja oksüdeeritud (triibuline tulp) tsütokroom *c* vormi sisaldavate lahuste ning *blank*-lahuse (ruuduline tulp) neelduvused. Tulemused väljendavad triplikaatide keskmist  $\pm$  SEM. Sisendgraafikul on esitatud redutseeritud ja oksüdeeritud tsütokroom *c* lahuste neeldumiste suhe ( $A_{red}/A_{oks.}$ ).

### 3.4 Küvetis spektrofotomeetriga mõõtmise tulemused

Hindamaks plaadilugejaga COX-i aktiivsuse määramise õigsust ja täpsust, teostati kõigepealt ensüümi aktiivsuse määramine siiani laialdaselt kasutusel oleva spektrofotomeetrilise meetodiga. 4 minuti jooksul langes tsütokroom *c* töölahuse  $A_{550\text{ nm}}$  näit kõigi ajukoe lahjenduste puhul u 0,7 ühikut ning neeldumise vähenemise kiirus oli proportsionaalne ajukoe lahjendusega (joonis 10). Tsütokroom *c* oksidaasi poolt katalüüsitud reaktsiooni iseloomustas kõige paremini ühefaasiline kustuv eksponent, mida väljendab valem  $a = a_0 e^{-kt}$ , kus  $t$  tähistab aega,  $k$  näilist kiiruskoefitsienti ning  $a$  ja  $a_0$  tähistavad tsütokroom *c* kontsentratsiooni vastavalt ajahetkel  $t$  ja  $t = 0$ . Selle valemi abil arvutati COX-i aktiivsust iseloomustavad näilised kiiruskoefitsiendid erinevate roti ajukoe lahjenduste jaoks, mis samuti vähenesid proportsionaalselt roti ajukoe lahjendusele (tabel 2).



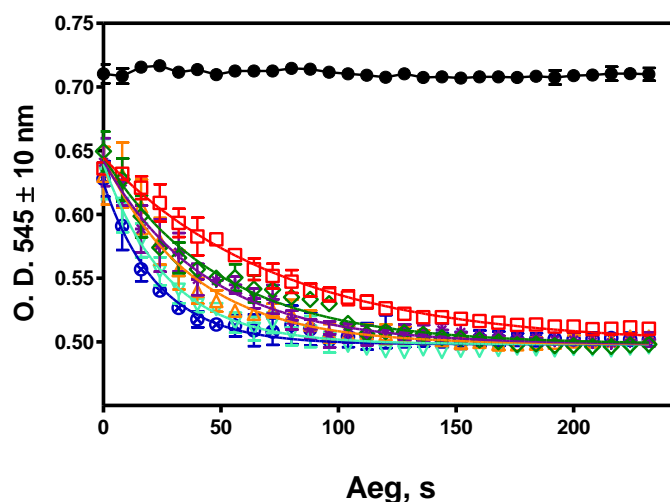
**Joonis 10.** Roti ajukoe tsütokroom *c* oksidaasi aktiivsuse mõõtmine küvetis. COX-i aktiivsus määrati järgmiste roti ajukoe lahjenduste puhul: 2000x (punane), 2500x (oranž), 3000x (roheline), 3500x (helesinine), 4000x (tumesinine) ja 5000x (lilla). Lisaks on esitatud ka tsütokroom *c* autooksüdatsioon (must). Esitatud on triplikaatide keskmised  $\pm$  SEM.

**Tabel 2.** Tsütokroom *c* oksüdatsiooni kiiruskoefitsiendid erinevate roti ajukoe lahjenduste puhul arvutatud spektrofotomeetri tulemuste põhjal.

Roti ajukoe lahjendus	Kiiruskoefitsient ( $k, s^{-1}$ )	SEM
2000x	0,0212	0,00011
2500x	0,0159	0,00009
3000x	0,0131	0,00011
3500x	0,0107	0,00006
4000x	0,0092	0,00010
5000x	0,0067	0,00008

### 3.5 96 süvendiga katseplaadil plaadilugejaga mõõtmise tulemused

Antud töö eesmärgiks oli välja töötada meetod, mille abil saaks mõõta ensüümi COX aktiivsust 96 süvendiga katseplaadil kasutades plaadilugejat. 4 minuti jooksul langes  $A_{545 \pm 10 \text{ nm}}$  näit kõigi ajukoe lahjenduste puhul umbes 0,2 ühikut ning neeldumise muutuse kiirus oli sarnaselt spektrofotomeetriga mõõtmiste tulemustele proportsionaalne ajukoe lahjendusega (joonis 11). Lisaks kirjeldas plaadilugejaga määratud  $A_{545 \pm 10 \text{ nm}}$  muutust ajas kõige paremini samuti ühefaasiline kustuv eksponent, mille põhjal arvutati protsessi iseloomustavad kiiruskoefitsiendid erineva lahjendusega ajukoe lahuste jaoks (tabel 3).



**Joonis 11.** Roti ajukoe tsütokroom *c* oksidaasi aktiivsuse mõõtmine 96 süvendiga katseplaadil. COX-i aktiivsus määrati järgmiste roti ajukoe lahjenduste puhul: 2000x (sinine), 2500x (helesinine), 3000x (oranž), 3500x (lilla), 4000x (tumeroheline) ja 5000x (punane). Lisaks on esitatud ka tsütokroom *c* autooksüdatsioon (must). Esitatud on triplikaatide keskmised  $\pm$  SEM.

**Tabel 3.** Tsütokroom *c* oksüdatsiooni kiiruskoefitsiendid erinevate roti ajukoe lahjenduste puhul arvutatud plaadilugeja tulemuste põhjal.

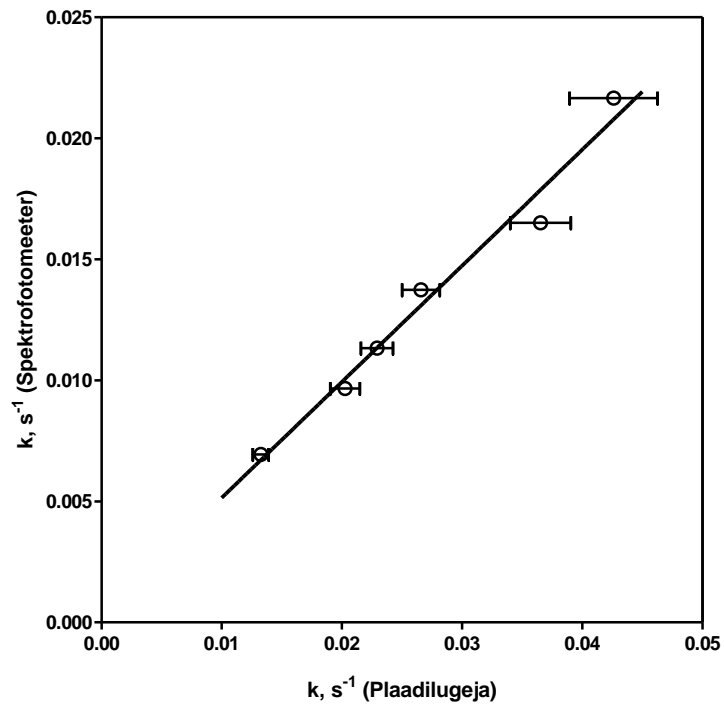
Roti ajukoe lahjendus	Kiiruskoefitsient ( $k, s^{-1}$ )	SEM
2000x	0,043	0,0037
2500x	0,037	0,0025
3000x	0,027	0,0016
3500x	0,023	0,0013
4000x	0,020	0,0012
5000x	0,013	0,0007

### 3.6 Kahe meetodi tulemuste võrdlus

Võrreldes spektrofotomeetriga ja plaadilugejaga mõõdetud tsütokroom *c* töölahuse neelduvuse muutuse ulatust roti ajukoe COX-i toimel vastavalt lainepikkustel  $550 \pm 0,1$  nm ja  $545 \pm 10$  nm, on näha, et esimese meetodi puhul on mõõtmisaken  $\sim 0,8$  ühikut (1,4 kuni 0,6) ning teise meetodi puhul  $\sim 0,2$  ühikut (0,7 kuni 0,5). Kuigi mõõtmisakende suurus erines oluliselt meetodite vahel, olid neelduvuse muutuse kiirused mõlema meetodi puhul proportsionaalsed ajukoe lahjendusega (joonised 10 ja 11). Tsütokroom *c* töölahuse ligi kahekordne neelduvusintensiivsuste erinevus on põhjustatud tõenäoliselt sellest, et neelduvust määrati

erinevates lainepikkusvahemikes. Plaadilugeja puhul oli mõningal määral probleemiks ka asjaolu, et mõõtmist ei olnud võimalik alustada koheselt pärast ajukoe lahuse lisamist, kuna plaadilugejal kulus aega katseplaadi liigutamiseks mõõtmisasendisse ning algne neelduvuse muutus jäi seetõttu detekteerimata (joonis 11). Seevastu spektrofotomeetriliste mõõtmiste puhul oli puuduseks aja- ja materjalikulukus, sest korraga sai teostada vaid ühe proovi COX-i aktiivsuse määramist. Plaadilugeja puhul oli samaaegselt mõõdetavate lahuste hulk piiratud vaid sellega, kui palju ajukoe proove on võimalik samaaegselt katseplaadile kanda. Suurem ajakulu oli probleemiks ka seetõttu, tsütokroom *c* töölahused ja ajukoe lahused pole stabiilsed pikema aja jooksul ning seetõttu võivad mõõtmistulemused üksteisest oluliselt erineda. Samuti oli plaadilugeja materjalikulu poole väiksem võrreldes spektrofotomeetri meetodiga.

Mõlema meetodiga saadud katseandmete põhjal arvutatud kiiruskoefitsientide väärtuste muutused olid sarnaselt neelduvusintensiivsuste muutusega ajas proportsionaalsed ajukoe lahjendustega (tabel 2 ja 3). Kui võrrelda eri meetodil määratud kiiruskoefitsiente omavahel, siis plaadilugejaga saadud andmetest määratud väärtused olid ligi kaks korda suuremad. Selle üheks põhjuseks võisid jällegi olla erinevused lainepikkuste vahemikus, mille juures neelduvusi määrati. Samuti olid plaadilugejaga määratud kiiruskoefitsientide vea väärtused oluliselt suuremad (tabel 2 ja 3). Kuid analüüsides kahe meetodi tulemuste omavahelist korrelatsiooni, rakendades regressioonanalüüsis kasutatavat vähim-ruutude meetodit, saadi korrelatsiooni-kordaja väärtuseks  $r^2 = 0,98$ , mis näitab head korrelatsiooni kahe meetodi tulemuste vahel (joonis 12). Seega võib saadud tulemusest järeldada, et tsütokroom *c* oksidaasi aktiivsuse määramist välja töötatud plaadilugeja meetodil võib pidada küllaltki usaldusväärseks.



**Joonis 12.** Spektrofotomeetri ja plaadilugeja meetodiga määratud kiiruskoefitsientide võrdlus. Võrreldud on 2000x, 2500x, 3000x, 3500x, 4000x ja 5000x lahjendusega roti ajukoe puhul määratud COX-i aktiivsust kirjeldavaid kiiruskoefitsiente. Esitatud on triplikaatides teostatud mõõtmiste tulemuste põhjal arvutatud väärtused  $\pm$  SEM.

# **Tsütokroom *c* oksidaasi aktiivsuse mõõtmine 96 süvendiga katseplaadil**

Laura Läll

## **KOKKUVÕTE**

Käesoleva bakalaureusetöö raames kirjeldati meetodi välja töötamist tsütokroom *c* oksidaasi aktiivsuse mõõtmiseks roti ajukoe proovides 96 süvendiga katseplaadil plaadilugejaga, mis on võrreldes konventsionaalse spektrofotomeetrilise meetodiga väiksema aja- ning materjalikuluga. Nimetatud meetodi väljatöötamise vajaduse tingis TÜ Psühholoogia instituudi psühhofüsioloogia töögrupi huvi määrata COX-i aktiivsust suure hulga katseloomade ajukudedes, et uurida oksüdatiivse metabolismi ja depressiooni vahelisi seoseid.

Töö teoreetilises osas anti ülevaade ensüüm tsütokroom *c* oksidaasist ja selle substraadist tsütokroom *c*-st. Täpsemalt kirjeldati nende ülesannet ja olulisust organismis ning iseloomustati struktuuri ja töömehhanismi. Lisaks tutvustati lühidalt tsütokroom *c* oksidaasi aktiivsuse hindamisel seni enim kasutatava spektrofotomeetrilise meetodi põhimõtet. Viimaks anti ka põgus ülevaade tsütokroom *c* oksidaasi häiretega seotud haigustest.

Plaadilugejaga roti ajukoes COX-i aktiivsuse määramise valiidsuse kontrollimiseks töö praktilises osas otsustati teostada mõõtmised paralleelselt ka spektrofotomeetriga ning analüüsida kuivõrd hästi kahe meetodi tulemused omavahel kokku langevad. Erinevate meetoditega teostatud mõõtmiste tulemuste võrdlemise tulemusena leiti, et plaadilugejaga määratud COX-i aktiivsuse tulemused korreleeruvad väga hästi spektrofotomeetrilisel meetodil mõõdetud tulemustega. Kuigi plaadilugeja meetod andis mõnevõrra ebatäpsemad tulemused võrreldes spektrofotomeetrilise meetodiga, on esimese eeliseks väiksem aja- ning materjalikulu. Kokkuvõtteks võib öelda, et on edaspidiseks kasutamiseks välja töötatud piisavalt usaldusväärne meetod suuremas koguses roti ajukoe proovides COX-i aktiivsuse määramiseks.

## **TÄNUAVALDUSED**

Käesoleva töö autor tänab oma juhendajat teadur Argo Vonki.



## KASUTATUD KIRJANDUS

Belevich I., Verkhovsky M. I., Wikström M. (2006) Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome *c* oxidase. *Nature*. **440**, 829-832.

Bisswanger H. (2002) *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*. Wiley-Blackwell, Weinheim.

Bratton M., Mills D., Castleden C. K., Hosler J., Meunier B. (2003) Disease-related mutations in cytochrome *c* oxidase studied in yeast and bacterial models. *Eur. J. Biochem*. **270**, 1222-1230.

Canadian Chiropractor. <http://www.canadianchiropractor.ca/content/view/2132/> viimati alla laetud 27.05.2013.

Casiday R., Herman C., Frey R. *Energy for the Body: Oxidative Phosphorylation*; <http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/Cytochromes/cytochromes.html> viimati uuendatud 09.05.2008.

Chinnery P. F. Mitochondrial Disorders Overview; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1224/> viimati uuendatud 16.09.2010.

Copeland R. A. (2000) *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Cuperus R., Leen R., Tytgat G. A. M., Caron H. N., Kuilenburg A. B. P. (2010) Fenretinide induces mitochondrial ROS and inhibits the mitochondrial respiratory chain in neuroblastoma. *Cell. Mol. Life Sci*. **67**, 807-816.

DiMauro S., Schon E. A. (2003) Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *N. Engl. J. Med*. **348**, 2656-2668.

Garrett R. H., Grisham C. M. (1999) *Biochemistry*. Saunders College Publishing, Orlando.

Gropman A. L. (2001) Diagnosis and Treatment of Childhood Mitochondrial Diseases. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep*. **1**, 185-194.

Iwata S., Ostermeier C., Ludwig B., Michel H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature*. **376**, 660-669.

Lehninger A. L., Nelson D. L. and Cox M. M. (2004) *Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A., Krieger M., Scott M. P., Zipursky S. L., Darnell J. (2003) *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, New York.

Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D. Darnell J. (2000) *Molecular Cell Biology*. W. H Freeman and Company, New York.

Lucas M. F., Rousseau D. L., Guallar V. (2011) Electron transfer pathway of cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1807**, 1305-1313.

Maneg O., Malatesta F., Ludwig B., Drosou V. (2003) Interaction of cytochrome *c* with cytochrome oxidase: two different docking scenarios. *Biochim. Biophys. Acta*. **1655**, 274-281.

Michel H., Behr J., Harrenga A., Kannt A. (1998) CYTOCHROME C OXIDASE: Structure and Spectroscopy. *Annu. Rev. Biomol. Struct.* **27**, 329-356.

Murphy J. L., Ratnaike T. E., Shang E., Falkous G., Blakely E. L., Alston C. L, Taivassalo T., Haller R. G., Taylor R. W., Turnbull D. M. (2012) Cytochrome *c* oxidase-intermediate fibres: Importance in understanding the pathogenesis and treatment of mitochondrial myopathy. *Neuromuscul. Disord.* **22**, 690-698.

Murray J., Schilling B., Row R. H., Yoo C. B., Gibson B. W., Marusich M. F., Capaldi R. A. (2007) Small-scale immunopurification of cytochrome *c* oxidase for a high-throughput multiplexing analysis of enzyme activity and amount. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **48**, 167-178.

Ow Y. P., Green D. R., Hao Z., Mak T. W. (2008) Cytochrome *c*: functions beyond respiration. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 532-542.

Pecina P., Houštková H., Hansiková H., Zeman J., Houštek J. (2004) Genetic Defects of Cytochrome *c* Oxidase Assembly. *Physiol. Res.* **53**, 213-223.

Pettigrew G. W., Moore G. R. (1987) *Cytochromes c – Biological Aspects*. Springer-Verlag, Berlin.

Richter O.-M. H., Ludwig B. (2003) Cytochrome *c* oxidase – structure, function, and physiology of a redox-driven molecular machine. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **147**, 47-74.

Sakamoto K., Kamiya M., Imai M., Shinzawa-Itoh K., Uchida T., Kawano K., Yoshikawa S., Ishimori K. (2011) NMR basis for interprotein electron transfer gating between cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 12271-12276.

Sanishvili R., Volz K. W., Westbrook E. M., Margoliash E. (1995) The low ionic strength crystal structure of horse cytochrome *c* at 2.1 Å resolution and comparison with its high ionic strength counterpart. *Structure*. **3**, 707-716.

Shoubridge E. A. (2001) Cytochrome *c* Oxidase Deficiency. *Am. J. Med. Genet.* **106**, 46-52.

Smith A. D., Datta S. P., Howard Smith G., Campbell P. N., Bentley R., McKenzie H. A. (1997) *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press, New York.

Stevens J. M., Daltrop O., Allen J. W. A., Ferguson S. J. (2004) C-type Cytochrome Formation: Chemical and Biological Enigmas. *Acc. Chem. Res.* **37**, 999-1007.

Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., Yoshikawa S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. *Science*. **272**, 1136–1144.

Voet D., Voet J.G. (2004) *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Voet D., Voet J.G. (2011) *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Wikimedia Commons. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cytochrome\\_c.png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cytochrome_c.png) viimati alla laetud 27.05.2013.

Yoshikawa S., Muramoto K., Shinzawa-Itoh K. (2011) Proton-Pumping Mechanism of Cytochrome *c* Oxidase. *Annu. Rev. Biophys.* **40**, 205-223.

Yoshikawa S., Muramoto K., Shinzawa-Itoh K., Mochizuki M. (2012) Structural studies on bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1817**, 579-589.

# **The measuring of cytochrome *c* oxidase activity with a 96-well plate**

Laura Läll

## **SUMMARY**

With this research a new method was developed to measure cytochrome *c* oxidase activity in a rats brain tissue samples using 96 well plate-based assay which compared to the conventional spectrophotometric method is less time and material consuming. The need for the development of the aforementioned method was necessitated by the psychophysiology workgroup of the Psychology institute of Tartu University who was interested in determining cytochrome *c* oxidase activity levels on a large amount of test animal brain tissue to link oxidative metabolism with depression.

A review of the enzyme cytochrome *c* oxidase and of its substrate cytochrome *c* was given in the theoretical part of the research, including their function, importance in living organisms, structure and operating mechanisms. In addition a brief overview of the principles of spectrophotometric method was given since this method has been most widely used so far. Finally a concise review of diseases connected to cytochrome *c* oxidase malfunctions were introduced.

To verify the validity of the determination of cytochrome *c* oxidase activity in a rat's brain tissue using 96-well plate-based assay, parallel measurements were carried out using spectrophotometric method. Both results were analysed and a positive correlation was found. Despite the somewhat imprecise results of the method using a 96 well plate-based assay the spectrophotometric method is still more time and material consuming. In conclusion, a method of sufficient reliability has been developed to determine the activity of cytochrome *c* oxidase in a large amount of rat brain tissue samples.